Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Weitere Anreicherung von teilweise gereinigtem Fibroblasten-Interferon

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Claudia Wojatschek
aus Stuttgart - Bad Cannstatt

1983

UNIV.
LEIDEN
LIBR.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547613_0020

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Weitere Anreicherung von teilweise gereinigtem Fibroblasten-Interferon

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Claudia Wojatschek
aus Stuttgart - Bad Cannstatt

1983

Dekan:	Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter:	Frau Privatdozent Dr. E. Heidemann
2. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Niethammer

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

INHALT

	Seite
Verwendete Abkürzungen	1
1. Einleitung	2
2. Material und Methoden	4
2.1 Ausgangssubstanz	4
2.2 Stabilitätsversuche	4
2.3 Säulenchromatographie	5
2.3.1 Hydrophobe Chromatographie mit Phenylsepharose CL - 4B	5
2.3.2 Affinitätschromatographie mit Blue Sepharose CL - 6B	7
2.3.3 Bestimmung der IFN-Konzentration	8
2.3.4 Proteinbestimmung	9
3. Ergebnisse	10
3.1 Stabilitätsversuche	10
3.2 Säulenchromatographie	12
3.2.1 Phenylsepharose CL - 4B	12
3.2.2 Blue Sepharose CL - 6B	16
3.2.3 Proteinbestimmung	19
4. Diskussion	19
4.1 Blue Sepharose	19
4.2 Phenylsepharose	20
4.3 Variation der Elutionsbedingungen	21
4.4 Stabilitätsprobleme	22
4.5 Proteinbestimmung	22
4.6 Weitere Möglichkeiten der Reinigung des hu IFN ß	23
5. Zusammenfassung	25
6. Literatur	27

Verwendete Abkürzungen

hu IFN α	humanes Leukozyteninterferon
hu IFN β	humanes Fibroblasteninterferon
hu IFN γ	humanes Immuninterferon
IE	Internationale Einheit, definiert als die Menge Interferon, die 50 % des Zellrasens einer Indikatorkultur vor der Lyse durch das Virus der vesikulären Stomatitis bewahrt
La-Azetat	Lanthanazetat
Poly (IC)	Polyinosin-Polycytidyl-Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure

1) Einleitung

1957 beschrieben Isaacs und Lindenmann (38) eine körpereigene Substanz, die Körperzellen vor Virusinfektionen zu schützen vermag (3,4,27,30,39). Wegen der Interferenz mit der Virusvermehrung nannten sie die Substanz Interferon.

Neben dem antiviralen Effekt besitzen Interferone die Fähigkeit, das Wachstum und die Vermehrung von Tumorzellen zu hemmen (31,50,51) und sowohl die Toxizität von Lymphozyten gegen ihre Zielzellen (37) wie auch die primäre Antikörperantwort zu verstärken (10,29,43,47).

Versuche, Interferon zur Behandlung verschiedener Tumoren einzusetzen, lassen noch keine endgültigen Aussagen über dessen Wirksamkeit zu. Nur wenige Patienten konnten bisher mit Interferon behandelt werden; darunter Patienten mit Osteosarkom (60,61,62), Plasmozytom (50), Bronchialkarzinom, M. Hodkin (7), Mammakarzinom (54). Zum Teil wird von guten Erfolgen berichtet. Doch ist die Zahl der behandelten Patienten noch zu klein und die Ergebnisse zu widersprüchlich für statistisch signifikante Aussagen.

Interferon ist keine einheitliche Substanz, sondern stellt eine Gruppe von Glykoproteinen dar (2,3,25,28,35,44), die sich bezüglich ihrer chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften unterscheiden (17). Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 18000 und 30000. Beim Menschen werden drei Hauptgruppen (je nach Mutterzelle) unterschieden (11,12,33,40,52): hu IFNα und β werden von menschlichen Leukozyten bzw. Fibroblasten nach Induktion mit Viren oder doppelsträngiger RNA gebildet (26,32). Beide sind säurestabil, unterscheiden sich jedoch bezüglich

Antigenität und Aktivität in heterologen Zellen. Hu IFN γ (=Immuninterferon) wird nach Antigen- oder Mitogenstimulation von T-Lymphozyten gebildet. Es ist säureinstabil und besitzt nach bisherigen Ergebnissen eine höhere antiproliferative Wirkung als IFN α und β (16). Alle drei Interferone wirken weitgehend speziesspezifisch.
Noch ist nicht zweifelsfrei erwiesen, daß die beobachtete Proliferationshemmung durch Interferon selbst bewirkt wird (18,46). Daher ist die Herstellung genügend großer Mengen eines möglichst hochgereinigten Interferons nicht nur für klinische Studien wichtig. Auch zur Untersuchung von Wirkungsmechanismen in vitro ist die Verwendung hochgereinigten Interferons unerläßlich.

Ziel dieser Arbeit war die weitere Anreicherung eines teilweise gereinigten hu IFN ß mit Hilfe der Säulenchromatographie, wobei Phenylsepharose und Blue Sepharose (Knight,45; Friesen,28) miteinander verglichen wurden.

2. Material und Methoden

2.1. Ausgangssubstanz

Verwendet wurde menschliches, teilweise vorgereinigtes IFN ß (Fa.Bioferon/Rentschler, Laupheim). In 1 ml Lösung befanden sich 3,2 x 10^6 IE IFN ß mit einer spezifischen Aktivität von 1-2 x 10^6 IE/mg Protein. Gewonnen wurde dieses IFN aus menschlichen diploiden Fibroblasten (FS-4), nachdem diese mit poly (IC), Cycloheximid und Aktinomycin D induziert worden waren (63). Das derart gewonnene IFN wurde mittels Perchlorsäure und Ammoniumsulfat-Präzipitation angereichert und anschließend durch Sephadex G25 Chromatographie und Ultrafiltration teilweise gereinigt. Die Lösung wurde in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2. Stabilitätsversuche

Die hohe Instabilität des IFN ß macht dessen Reinigung sehr problematisch. Zur Ermittlung der günstigsten Bedingungen wurden einige Proben folgendermaßen behandelt:

2.2.1 Auftauen der bei -176° eingefrorenen Lösung bei a) Zimmertemperatur, b) 4° C.

2.2.2 Aufbewahrung für 5 Tage bei 4° C, 6° C, 20° C und zwar jeweils mit verschiedenen Stabilisatoren:
50 % Glycerin; 25 %, 50 %, 75 % Äthylen- bzw. Propylenglykoll; 2 mmol/l La-Azetat (Fluka,Ulm).

2.2.3 Auswirkung von Temperatursprüngen:

a) 4° C → 20° C

b) 4° C → - 78,5° C (Trockeneis)

c) 4° C → - 176° C → - 78,5° C

2.3. Säulenchromatographie

2.3.1 Hydrophobe Chromatographie mit Phenylsepharose CL - 4B

Die verwendeten Säulen (RCT-Multichrom-Säulen, Reichelt, Heidelberg, Innendurchmesser 0,9 cm) wurden in der Regel mit 70 %igem Alkohol gereinigt. Um zu vermeiden, daß ein Teil des IFN an unspezifische Bindungsstellen gebunden wird, wurden alle Schläuche vor Gebrauch mit einer sterilen 0,7 %igen Humanalbuminlösung (Humanalbumin reinst, Behringwerke, Marburg, gelöst in Pufferlösung) gründlich gespült. Bei einigen Läufen wurden die Säulen silikonisiert, um dadurch die Bindung des IFN ß an das Glas zu erschweren.

Das zu einer gießbaren Suspension aufgeschwemmte Gel (Phenylsepharose CL -4B, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) - Gesamtvolumen 5 ml - wurde sorgfältig mit einer Wasserstrahlpumpe entlüftet und bei Zimmertemperatur vorsichtig in eine senkrecht aufgehängte Säule eingefüllt. (Packungsdruck 10 cm). Bei einer Gelhöhe von 5 cm und einem Säuleninnendurchmesser von 0,9 cm betrug das Gelvolumen 3 ml. Da sich Dextranblau an das Gel bindet, war eine Bestimmung des Bettvolumens nicht möglich. Die Äquilibrierung des Gels erfolgte bei 6^{o} C mit mindestens dem 20fachen Säulenvolumen der entgasten Pufferlösung bei einem Druck von 6 cm Wassersäule.

Alle Lösungen wurden mit einer saugenden Peristaltikpumpe (Präzisions-Schlauchpumpe 3600, Colora, Lorch) durch die Säule gepumpt.

Verwendete Pufferlösungen:

A) 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,8; 2,5 M Ammoniumsulfat

B) 0,5 M NaCl

C) 0,5 M NaCl, 2 mM La-Azetat

D) 0,1 M Citratpuffer pH 3,2

E) 0,1 M Citratpuffer pH 4

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen des Gels und damit zur Steigerung der Ausbeute wurde bei einigen der Läufe A-E nach der Äquilibrierung 0,7 %ige Humanalbuminlösung mit einer Laufgeschwindigkeit von 1,5 ml/h aufgetragen. Die Humanalbuminlösung wurde zuvor sterilfiltriert (Millex-GS, Porengröße 0,22 u, Millipore, Buc, Frankreich). Dadurch wurde vermieden, daß sich Festbestandteile oberhalb des Gels festsetzten, erst allmählich in Lösung gingen und so eine saubere Trennung störten. Danach folgte nochmals das 5-6fache Volumen der jeweiligen Pufferlösung.
2 ml der in flüssigem Stickstoff aufbewahrten IFN ß - Lösung wurden innerhalb von 24 Stunden bei 4^{o} C aufgetaut und mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/h aufgetragen. Anschließend wurde mit 9 ml der jeweiligen Startpufferlösung nachgewaschen, um alle nicht an das Gel gebundenen Substanzen zu eluieren. Beim Lauf A folgten danach noch 9 ml derselben Pufferlösung ohne Ammoniumsulfat und erneut 9 ml der Startpufferlösung. Mit 36 ml steigender Propandiol -1,2- Konzentration in der Pufferlösung wurde die Probe mit einer Laufgeschwindigkeit von 2 ml/h eluiert.
Ein eventuell noch verbliebener Rest wurde mit 6 ml 100 %igem

Propandiol vom Gel verdrängt. Das Eluat wurde in Fraktionen von jeweils 3 ml gesammelt. In den Auffangröhrchen befand sich schon vor dem Lauf Propandiol -1,2 in fallender Konzentration. So wurde gewährleistet, daß die Endkonzentration nach dem Lauf stets 50 % ergab. Die gesammelten Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei den Läufen 2,4,6,7,9,10 wurden sie zuvor sterilfiltriert.

2.3.2 Affinitätschromatographie mit Blue Sepharose -CL-6B

Das mindestens 12 Stunden in Aqua bidest. gequollene Gel wurde über einem Glasfaserfilter (GF/C Whatman, Maidstone England) gewaschen (pro Gramm Gel 200 ml Aqua bidest.), zu einer gießbaren Suspension aufgeschwemmt und solange mit der jeweiligen Pufferlösung gewaschen, bis der pH-Wert der Gelsuspension mit dem der Pufferlösung übereinstimmte. Das Gel wurde entgast und die Säule wie bei der hydrophoben Chromatographie gepackt. Die Äquilibrierung erfolgte 12 Stunden lang bei 4^{o} C mit der jeweiligen entgasten Pufferlösung bei einer Geschwindigkeit von 2 ml/h. (5 cm Gelhöhe ≙ 3ml Gelvolumen).

Bei allen durchgeführten Versuchen wurde eine mit neuem Gel frisch gepackte Säule verwendet.

Verwendete Pufferlösungen:

A) 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,2,1M NaCl (45)

B) 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,0, 1,5 M NaCl (28)

C) die unter A und B genannten Lösungen, zusätzlich 2 mmol/l La-Azetat

Alle drei Läufe wurden sowohl mit als auch ohne vorheriges Auftragen von Humanalbumin (20 mg Humanalbumin in 3 ml Pufferlösung) durchgeführt. Auch hier wurde ein Versuch mit silikonisierten Säulen gemacht. In der Regel wurden 2 ml der

IFN ß-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 1ml/h aufgetragen. Anschließend wurde mit 9 ml der jeweiligen Pufferlösung (Geschwindigkeit von 1,5 ml/h) nachgewaschen, um alle nicht gebundenen Substanzen von der Säule zu entfernen. Dem Nachwaschen mit 9 ml der Pufferlösung folgte bei Versuch A und C ein linear ansteigender Gradient von Propandiol-1,2 (0-100 %). Zum Schluß wurden 6 ml 100 % Propandiol über das Gel geschickt, um sicher zu gehen, daß keine Substanzen mehr an das Gel gebunden waren.

Bei Versuch B dienten zur Elution 9 ml 30 % Propandiol-1,2 in Pufferlösung, anschließend ein ansteigender Gradient von 30-50 %, zuletzt noch 70 % und 100 % (jeweils 9 ml) Propandiol-1,2. Die Geschwindigkeit betrug bei jedem Versuch 1,5 ml/h. Die 6 ml-Fraktionen wurden sterilfiltriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei späteren Läufen wurde nicht mehr sterilfiltriert.

2.3.3 Bestimmung der IFN - Konzentration

Die Bestimmung der IFN ß - Konzentration in den einzelnen Fraktionen erfolgte durch den Plaque-Reduktionstest (K.-E. Joester und P.S. Schröder, Firma Bioferon/Rentschler GmbH, Laupheim). Verwendet wurden Rita - Zellkulturen (gewonnen aus Affennieren), die mit dem Virus der vesikulären Stomatitis infiziert worden waren. Durch Titration mit verschiedenen Verdünnungen der Fraktionslösungen wurde die höchste Verdünnung festgestellt, die gerade noch ausreicht, um 50 % der Zellen vor der Infektion zu schützen. Die IFN ß - Aktivität wurde in IE/ml bestimmt, bezogen auf den internationalen Standard G023-902-527 des Nat.Inst. of Health/Nat.Inst. of

Allergies and Infectious Diseases (USA). Um Aktivitätsverluste bei Versand und Verarbeitung auszugleichen, wurde jeweils ein Standard mitgeschickt, der anschließend als Bezugsgröße diente.

2.3.4 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der Fluorescamintest (P.Böhlen,8) in folgender Modifikation verwendet.

Verwendete Lösungen:

0.05 M Phosphatpuffer, pH 8

0,05 ml Fluorescamin (Fluram, puriss.,p.a.,Fluka,Ulm) in Dioxan (30 mg/100 ml)

Als Eichsubstanzen dienten Humanalbuminlösungen, die jeweils 50 % Propandiol-1,2 enthielten.

Für verschiedene Konzentrationsbereiche wurden verschiedene Eichkurven angefertigt. Je nach Proteinkonzentration wurden die Mengenverhältnisse von Proteinlösung, Phosphatpuffer und Fluorescamin-Dioxan-Lösung variiert. Bei Konzentrationen unter 0,01 mg/ml wurden in zwei Reagenzgläser je 0,5 ml der Eichlösung, der Probe und der Pufferlösung als Leerwert pipettiert. Alle drei Lösungen enthielten wie die Proben 50 % Propandiol. Für die Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,1 mg/ml wurden 0,250 ml und für über 0,1 mg/ml nur 0,2 ml der jeweiligen Lösungen pipettiert.

Jedem Ansatz wurde soviel Phosphatpuffer zugegeben, daß die Gesamtmenge 0,750 ml betrug. Dabei mußte stets beachtet werden, daß der pH der gemischten Lösung im Bereich zwischen 8 und 9 lag.

Zuletzt wurde unter gleichzeitigem kräftigen Schütteln 0,250 ml der Fluorescamin-Dioxan-Lösung in jedes Röhrchen pipettiert und die Lösungen anschließend eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Fluoreszenz wurde nach 30 Minuten mit dem Aminco-Bowman-Spektrometer (Anregung bei 390 nm, Emmission bei 475 nm) gemessen. Zur Messung verwendet wurden Aminco-Quarzküvetten.

3. Ergebnisse

3.1. Stabilitätsversuche

3.1.1 Erfolgte das Auftauen bei 4^{o} C, so lag der mittlere Aktivitätsverlust bei 6 % und wuchs auf rund 26 % für das Auftauen bei Raumtemperatur.

3.1.2 Stabilisierung: Wie Tabelle 1 zeigt, hat man bei 4^{o} C Lagerungstemperatur unter Zugabe eines 50 %igen Propandiolanteils die geringsten Aktivitätseinbußen. Nach 5 Tagen befanden sich noch mindestens 99 % der Ausgangsaktivität in der Lösung.

3.1.3 Die von Sedmak/Grossberg (57) beschriebene Stabilisierung und Reaktivierung des IFN ß durch Seltene Erden (La-Azetat) konnte nicht bestätigt werden. Das Gegenteil war der Fall: nach Zugabe von 2 mmol La-Azetat/ml IFN-Lösung und 5-tägiger Aufbewahrung bei 4^{o} C waren noch maximal 32 % der ursprünglichen Aktivität nachzuweisen. La-Azetat ist somit kein Stabilisator für IFN ß.

3.1.4 Bei Temperatursprüngen erleidet IFN ß die folgenden Aktivitätsverluste ($\Delta A^{T}_{\Delta t}$: Aktivitätsverlust in % nach Δ t Stunden bei T^{o} C):

TAB. 1 : Stabilität (in den Ausgangslösungen befanden sich je 320 000 IE hu IFN ß / ml)

Temperatur in °C	Glyzerin 50%	Propandiol 1,2 25%	50%	75%	10^3 IE IFNß /ml [1]
4	-	-	-	-	213
4	+	-	-	-	300
4	-	+	-	-	290
4	-	-	+	-	319
4	-	-	-	+	300
6	-	-	-	-	190
6	+	-	-	-	210
6	-	+	-	-	200
6	-	-	+	-	200
6	-	-	-	+	180
20	-	-	-	-	160
20	+	-	-	-	179
20	-	+	-	-	150
20	-	-	+	-	213
20	-	-	-	+	200

[1] Aktivität nach 5 Tagen

a) 4^{o} C ⟶ 20^{o} C; ΔA_{2}^{20} = 33 %

b) 4^{o} C ⟶ - $78,5^{o}$ C; $\Delta A_{24}^{-78,5}$ = 25 %

c) 4^{o} C ⟶ - 176^{o} C ⟶ - $78,5^{o}$ C; $\Delta A_{24}^{-176/-78,5}$ = 10 %

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle Proben wie in c) behandelt.

3.2 Säulenchromatographie

3.2.1 Phenylsepharose CL - 4B

Wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, war die Anreicherung mit maximal 1:10 gering. Die Ausbeute betrug maximal 40 %.
Zur Eliminierung einer den Plaque-Reduktionstest störenden bakteriellen Kontamination des Eluats wurden anfangs alle Fraktionen sterilfiltriert. Dieser Schritt wurde später unterlassen, nachdem mehrmals hintereinander fast keine Aktivität im Filtrat (< 2 % der Ausgangslösung) mehr meßbar war. Daraufhin wurden wieder ähnliche Ergebnisse erzielt wie zuvor mit Sterilfiltrieren. Die Adsorption an den Filter ist offensichtlich inkonstant.

3.2.1.1 Pufferlösung P_1 : 0,01 M Phosphatpuffer, pH6,8,
2,5 M Ammoniumsulfat

Gradient: 0-100 % Propandiol

Abbildung 1 zeigt die Elutionskurve eines typischen Laufes ohne vorheriges Auftragen einer Humanalbuminlösung. Wie daraus zu ersehen ist, wurde hu IFN ß ab einer Konzentration von 40 % von den Bindungsstellen des Gels verdrängt. Das Maximum der Elutionskurve lag in der Regel bei 60 - 70 % Propandiol.
Ein großer Teil der kontaminierenden Proteine befand sich im Durchlauf. Ohne Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch Humanalbumin und ohne Sterilfiltration der einzelnen

TAB. 2: Phenylsepharose CL-4B

Säulenlauf Nr.	Puffer	Aufgetragen 10^6 IE / 2 ml	Steril-filtriert	HA[3]	Spez. Aktivität 10^3 IE / mg Protein	Ausbeute in %	Anreicherung (-fach)
1	P1[1]	2,56	-	-	1,6	12	10,6
2		2,56	+	+	1,06	6	7
3		6,4[2]	-	-	1,66	15	11
4		6,4[2]	+	+	0,9	12,5	6
5		6,4[2]	-	-	1,4	10	9,3
6	P2[1]	3,2	+	+	0,25	38	1,6
7		3,2	+	-	0,27	31	1,7
8	P3[1]	3,84	-	+	1,5	40	10
9		3,84	+	-	1,8	25	12
10	P4[1]	3,84	+	+	0,2	18	1,3

[1] P1 = 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,8 / 2,5 M NH_4SO_4 P2 = 0,5 M NaCl
P3 = Citratpuffer* pH 3,2 P4 = Citratpuffer* pH 4,0

[2] ohne Standard (*0,1 M)

[3] HA = Humanalbumin

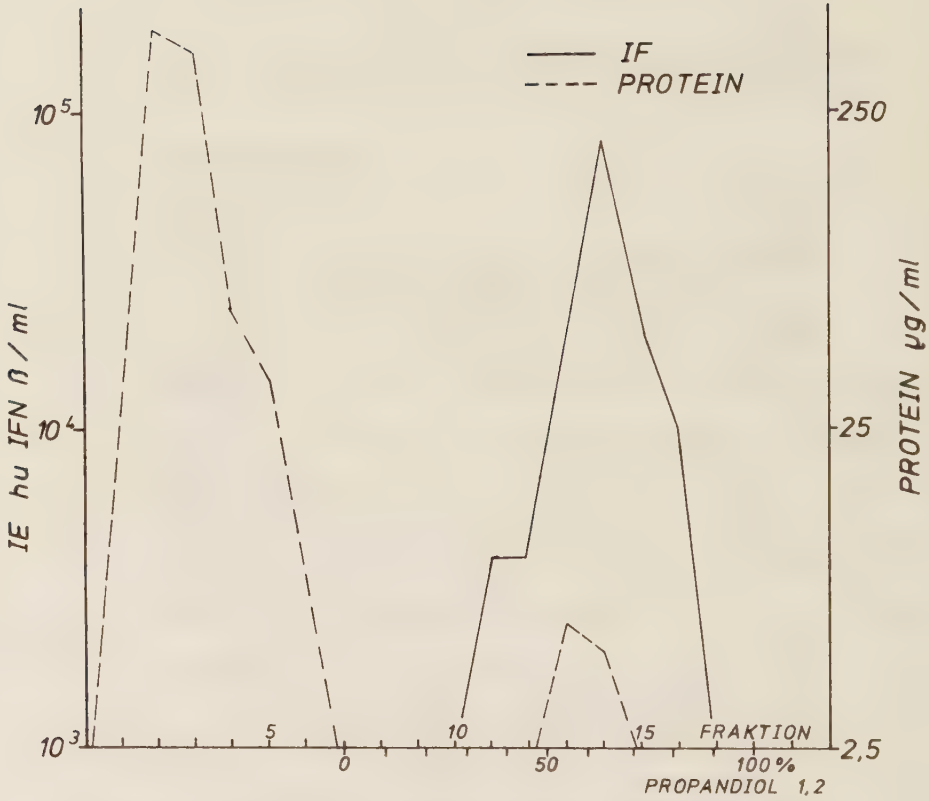

ABB. 1: $4{,}4 \cdot 10^6$ IE hu IFN ß / 2 ml über Phenyl-sepharose CL-4B
(spez. Aktivität: $1{,}66 \cdot 10^7$ IE hu IFN ß / mg PROTEIN
Ausbeute: 15,3%)

FRAKTION 1-3: 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,8 / 2,5 M NH_4SO_4
FRAKTION 4-6: 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,8

Fraktionen betrug die in der Regel erreichte spezifische Aktivität am Maximum der Elutionskurven 1,4 - 1,8 x 10^7 IE IFN ß/mg Protein, die Gesamtausbeute maximal 20 %.
Durch Auftragen einer Humanalbuminlösung vor dem eigentlichen Lauf wurden geringere Anreicherungen (max. 1,06 x 10^7 IE IFN/mg Protein) erzielt; die Ausbeuten waren zum Teil geringfügig höher (ohne Sterilfiltration um maximal 5 %).

3.2.1.2 Lösungsmittel : 0,5 M NaCL

Gradient: 0-100 % Propandiol

Wiederum erschien IFN ß ab einer Konzentration von 40 % Propandiol im Eluat; das Maximum der Elutionskurve lag bei 75 %. Mit dem hier verwandten Lösungsmittel konnten spezifische Aktivitäten von nur durchschnittlich 2,5 x 10^6 IE IFN ß/mg Protein erzielt werden. Wurde vor dem Lauf Humanalbumin aufgetragen, so war das Eluat eher noch weniger rein als die aufgetragene IFN ß-Lösung ($<$1 x 10^6 IE/mg). Die Ausbeute betrug 30 bis 40 %.

3.2.1.3 Pufferlösung : 0,1M Citratpuffer pH3,2

Gradient: 0 - 100 % Propandiol

Wegen der höheren Stabilität des hu IFN ß bei niedrigen pH- Werten wurde versucht, mit einer sauren Pufferlösung eine bessere Ausbeute zu erzielen. Die Elution erfolgte mit 50 % - 100 % Propandiol. Am Maximum der Elutionskurve betrug die spezifische Aktivität nur maximal 5 x 10^6 IE IFN ß/mg Protein, während das IFN, welches schon bei 50 - 70 % in den Fraktionen erschien, höher angereichert war (bis 1,8 x 10^7 IE/mg Protein). Die Ausbeute betrug ohne Sterilfiltration 40 %.

3.2.1.4 La-Azetat-haltige Pufferlösungen

Verwendet wurden dieselben Pufferlösungen wie unter 3.2.1.1 und 3.2.1.2 angegeben, jeweils mit dem Zusatz von 2 mmol La-Azetat/l. Unabhängig von der verwandten Pufferlösung erschien IFN jedesmal schon im Durchlauf (Ausbeute von 1.5 %).

3.2.1.5 Silikonisierung der Säulenwand

Um eine eventuelle Bindung des IFN an die Glaswand einer Säule auszuschalten, wurden bei einigen Läufen die Säulenwände vor dem Versuch silikonisiert. Bei diesen Versuchen erschien nur sehr wenig IFN im Eluat (weniger als 15 % Ausbeute), so daß anzunehmen ist, daß ein großer Teil des IFN ß von den Silikongruppen gebunden wurde.

3.2.2 Blue Sepharose CL - 6B

Eine weitere Möglichkeit, Glykoproteine zu reinigen, stellt die Chromatographie mit Blue Sepharose dar. Einige der durchgeführten Läufe sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Ergebnisse wurden zum Teil stark davon beeinflußt, ob vor dem Lauf Humanalbumin aufgetragen wurde und ob zum Schluß sterilfiltriert wurde. Abbildung 2 zeigt die Elutionskurve eines typischen Laufes. Hu IFN ß wurde ab einer Propandiolkonzentration von 50 % von seinen Bindungsstellen am Gel verdrängt. Das Maximum der Elutionskurve lag bei 65 - 80 % Propandiol. Auch hier befanden sich die höchsten Proteinkonzentrationen im Durchlauf.
Die erreichten spezifischen Aktivitäten betrugen meist 1,5 - 3,7 x 10^7 IE IFN/mg Protein. Im Versuch mit dem günstigsten Ergebnis betrug die spezifische Aktivität 7,1 x 10^7 IE/mg Protein (es wurde hier keine Humanalbuminlösung aufgetragen), bei einer Ausbeute von 71 %. In der Regel wurde bei Verzicht

TAB. 3: Blue - Sepharose

Säulenlauf Nr.	Puffer	Aufgetragen 10^6 IE / 2 ml	Steril-filtriert	HA [2]	Spez. Aktivität 10^6 IE / mg Protein	Ausbeute in %	Anreicherung (-fach)
1	P 1 [1]	3,84	-	-	3,7	75	24
2		3,2	-	-	7,1	71	46
3		4,2	+	+	1,5	23,9	10
4		1,28	+	-	3,4	37	22
5		1,28	+	+	1,53	35	10
6		5,3	+	+	3,3	20	22
7		5,3	+	-	1,6	17	10,6
8		5,12	-	-	3,07	42	20,4
9	P 2 [1]	3,2	+	+	0,6	12	4
10		3,2	+	-	1,2	15	8
11		4,6	-	-	0,8	20	5,3

[1] P 1 = 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,2 / 1 M NaCl
P 2 = 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,0 / 1,5 M NaCl

[2] HA = Humanalbumin

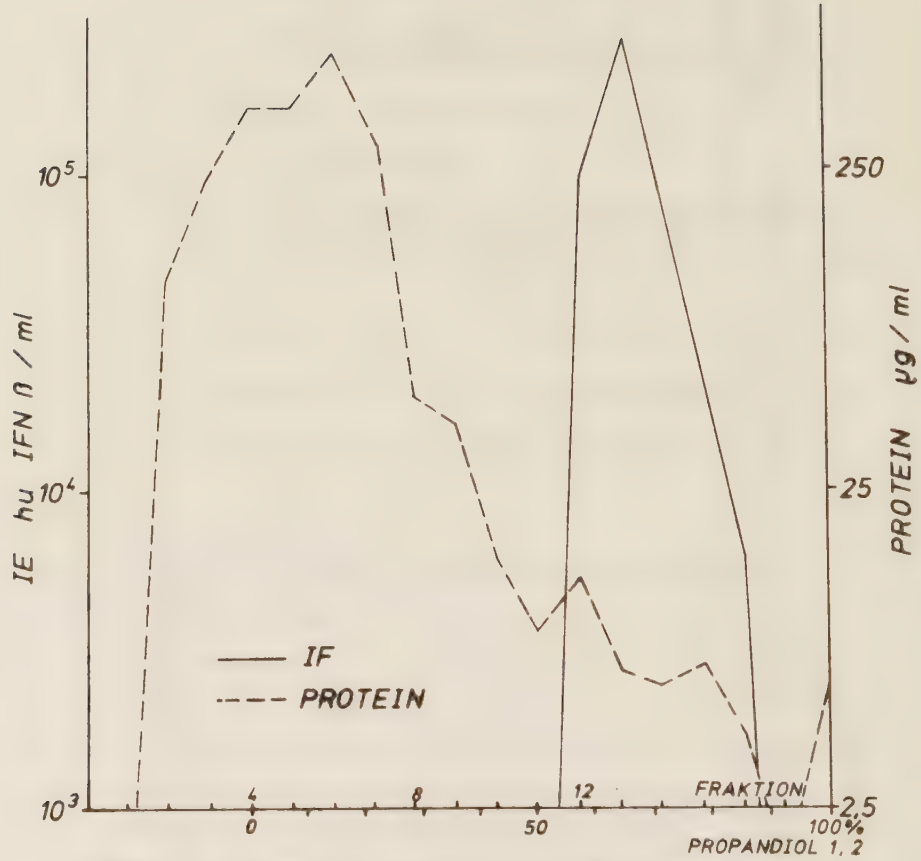

ABB. 2: $3{,}84 \cdot 10^6$ IE hu IFN ß / 2 ml über Blue-Sepharose CL - 6 B
(spez. Aktivität: $3{,}7 \cdot 10^7$ IE hu IFN / mg PROTEIN
Ausbeute: 75 %)
FRAKTION 1-3: 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,2 / 1 M NaCl

auf das Sterilfiltrieren Ausbeuten von 40 - 70 % erreicht. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen des Gels mit einer Humanalbuminlösung lagen die erreichten spezifischen Aktivitäten erheblich niedriger (in der Regel $1{,}5 \times 10^7$ IE IFN/mg Protein). Die Ausbeuten waren nicht -wie anfangs aufgrund verschiedener Vorversuche angenommen wurde- wesentlich höher als bei den Läufen ohne Humanalbumin.

Der Versuch, durch Zugabe von 2 mmol La-Azetat/lPufferlösung die Ergebnisse zu verbessern, gelang auch hier nicht. Wie bei der Phenylsepharose erschien hu IFN ß schon beim Nachwaschen des Gels im Eluat, wurde also nicht mehr an das Gel gebunden. Mit silikonisierten Säulen konnte auch bei der Blue Sepharose kaum hu IFN ß in den Fraktionen nachgewiesen werden ($<$ 5 % der ursprünglichen Aktivität).

3.2.3 Proteinbestimmung

Aufgrund von zwanzig Versuchen erwies sich der Fluorescamintest als eine zuverlässige Methode, um in Anwesenheit von Propandiol Proteinkonzentrationen bis minimal 500 ng/ml zu messen. Im unteren Bereich verläuft die Eichkurve nicht mehr streng linear.

4. Diskussion

4.1 Blue Sepharose

Die Chromatographie an Blue Sepharose erwies sich mit einer Anreicherung von bis zu 70fach und einer Ausbeute von bis zu 75 % als die bessere der beiden getesteten Reinigungsverfahren. Die maximal erreichte Aktivität betrug $7{,}1 \times 10^7$ IE/mg Protein.

Ein ähnliches Verfahren wie das oben beschriebene wurde von Friesen et al. (28) angegeben (Pufferlösung B, siehe Abschnitt 2.3.2). Obwohl Friesen über ähnliche Ergebnisse berichtete wie Knight (45), wurden mit seiner Methode stets geringere Ergebnisse erzielt. Die spezifische Aktivität betrug hier bestensfalls 1×10^7 IE IFN/mg Protein und die Ausbeute durchschnittlich 10 - 20 %.

Die Bindung von IFN ß in Gegenwart von NaCl (1 bzw. 1,5 mol/l) und die Elution durch hydrophobe Medien zeigen, daß hydrophobe Wechselwirkungen bei der Trennung von Bedeutung sind und bestätigen den hydrophoben Charakter von IFN ß (14,19,20).

4.2 Phenylsepharose

Wegen der bekannten Hydrophobizität von Interferonen (14,19,20) wurde der Versuch der weiteren Reinigung von hu IFN ß durch hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose unternommen.

Die durchgeführten Versuche zeigten, daß IFN ß relativ fest an die Matrix des Gels gebunden wird.

Durch die steigende Lipophilie des Propandiolgradienten wurde die Bindung des IFN an das Gel abgeschwächt und IFN erschien ab einer 40 %igen Propandiolkonzentration im Eluat.

Obwohl verschiedene Pufferlösungen verwendet wurden, betrug die Ausbeute nie mehr als 40 %. Der Rest wurde wahrscheinlich an unspezifische Bindungsstellen der Säulenglaswand und der Schläuche -obwohl diese jedesmal vor Gebrauch sorgfältig mit einer Humanalbuminlösung gespült worden waren- gebunden oder verlor während der Reinigung an Aktivität.

Somit ist die Chromatographie an Phenylsepharose der an Blue Sepharose unterlegen.

4.3 Variationen der Elutionsbedingungen

Wegen der Gefahr des Aktivitätsverlustes bei der Separation wurde bei einigen Versuchen als erstes eine 0,7 %ige Humanalbuminlösung auf das Gel aufgetragen. Es zeigte sich jedoch, daß bei beiden Chromatographieverfahren dieses Vorgehen die Anreicherung negativ beeinflußte. Es ist anzunehmen, daß noch Spuren des aufgetragenen Humanalbumin zusammen mit IFN von der Säule eluiert wurden. Darüber hinaus waren die Ausbeuten nicht nennenswert von Versuchen ohne Humanalbumin verschieden.
Trotz der höheren Stabilität von IFN ß bei niedrigem pH wurden bei beiden Chromatographieverfahren durch eine saure Pufferlösung keine besseren Ergebnisse erzielt.
Bemerkenswert ist, daß sich nach Zusatz von 2 mmol La-Azetat /l Pufferlösung die gesamte Aktivität im Durchlauf befand. Wahrscheinlich bildet La-Azetat mit IFN einen Chelatkomplex und verhindert so die Bindung des IFN an Phenylsepharose und Blue Sepharose.
Wie schon erwähnt, ergab auch die Silikonisierung der Glassäule -unter der Vorstellung, auf diese Weise Bindungsstellen des Glases für IFN zu blockieren- nicht die erwartete Wirkung. Nur noch maximal 5 % der aufgetragenen Aktivität ließen sich in den Fraktionen nachweisen. IFN dürfte daher von den Silikongruppen gebunden werden.
Von einer Sterilfiltration der einzelnen Fraktionen ist abzuraten, da eine große Menge des IFN vom Filter gebunden wird. Um eine bakterielle Kontamination des Eluats zu vermeiden, wurden die Pufferlösungen versuchsweise sterilfiltriert und alle verwendeten Gefäße sterilisiert. Dieses Vorgehen erwies sich jedoch -verglichen mit Ergebnissen von Läufen unter sterilen Bedingungen (bezüglich der Interferon-Titerbestimmung)- als unnötig.

4.4 Stabilitätsprobleme

Interferone sind bekannt als sehr instabile Substanzen. Sie verlieren durch den Prozeß der Reinigung und Präparation einen erheblichen Teil ihrer Aktivität. Es wurden verschiedene Versuche unternommen, hu IFN ß gegen thermische und mechanische Inaktivierung zu stabilisieren. So beschrieben Edy et al (23) eine Stabilisierung durch sauren pH, Stewart et al (59) und Knight (45) eine solche bei Zusatz von Detergentien wie z.B. Natriumdodecylsulfat oder Tween 80 (22,57). Ähnlich wirken Äthylenglykoll (34), Proteine wie z.B. Rinderserumalbumin (21), Cytochrom c (2), chaotrope Salze (42) und nach Sedmak und Grossberg auch Seltene Erden (58).

Wahrscheinlich haben SH-Gruppen-stabilisierende Bedingungen wie z.B. ein saures Milieu protektive Wirkung auf die IFN-Aktivität.

Bei den unter 2.2 beschriebenen Stabilisierungsversuchen erwiesen sich der Zusatz von 50 % Propandiol als Stabilisator und die Temperatur von 4^{o} C als optimale Bedingungen für die Reinigung des IFN.

Eine Stabilisierung und Reaktivierung von hu IFN ß durch Seltene Erden (La-Azetat) konnte nicht festgestellt werden.

4.5 Proteinbestimmung

Wie oben erwähnt, stellte das in den einzelnen Fraktionen enthaltene Propandiol bei der Proteinbestimmung ein großes Problem dar. Schon geringe Spuren von Propandiol störten die meisten Proteinbestimmungsmethoden empfindlich. Die Eignung folgender Methoden wurden geprüft:

1. Amido-Schwarzmethode
2. Bio-Rad-Test (Mikro-Assay) (Bio-Rad Laboratories, 1979)
3. Coomassie Blue-Bestimmungsmethode (56)
4. Modifizierter Lowrytest nach Peterson (53)
5. UV-Absorption bei 280 nm
6. Fluorescamintest (8)
7. Dialyse der einzelnen Fraktionen gegen 0,9 % NaCl-Lösung zur Eliminierung des störenden Agens und anschließende Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad-Test.

Bei den Methoden 1-4 verhindert Propandiol offenbar die Bindung der verschiedenen Farbstoffe an bestimmte Proteingruppen. Die Dialyse gegen das 200fache Volumen 0,9 %iger NaCl-Lösung entfernte zwar das Propandiol, so daß der sehr empfindliche Bio-Rad-Test anwendbar wurde. Die so gewonnenen Werte für die Eichkurve streuten jedoch erheblich, so daß die Ergebnisse sehr ungenau wurden.
Als gute Möglichkeit, kleinste Proteinkonzentrationen in Anwesenheit von Propandiol zu messen, erwies sich der Fluorescamintest. Fluorescamin (4-phenylspiro (furan -2(3H), 1-phtalan) -3,3-dione) bindet primäre Aminogruppen und bewirkt so die quantitativ zu erfassende Fluoreszenz der Proteine. Proteinmengen bis herab zu 500ng sind zu bestimmen.

4.6 Weitere Möglichkeit der Reinigung des hu IFN ß

Außer der Phenylsepharose und der Blue Sepharose zeigte die Chromatographie an Con A Sepharose gute Ergebnisse (5,19,20,28,36). Spezifische Aktivitäten bis 2×10^7 IE/mg Proteine wurden erzielt.

Berichte über sehr gute Anreicherungen liegen mit der Metallchromatographie wie z.B. der Kupferchelat- (15,9) und der Zinkchelatchromatographie (24) vor. Hier sollen Reinigungen bis $2x10^9$ IE/mg Protein und eine Ausbeute von 50 % zu erzielen sein. Der ursprüngliche Plan, diese Methode anzuwenden, wurde fallen gelassen, da die Ergebnisse von anderen Zentren nicht bestätigt werden konnten. Analog der Reinigung von IFN α mit Anti-IFN α -Antikörpern (5,55) ist an eine Anreicherung von IFN ß mit entsprechenden Antikörpern zu denken. Dies ist jedoch wegen mangelnder Spezifität bisheriger Antikörperpräparationen nicht unproblematisch.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitere Anreicherung teilweise gereinigtem Fibroblasteninterferons. IFN ß mit einer spezifischen Aktivität von 1-2x10^6IE/mg Protein wurde durch Chromatographie an Blue Sepharose Cl-6B bis zu einer spezifischen Aktivität von 7,1x10^7IE/mg Protein gereinigt. Die Ausbeute betrug hierbei 40-70 %.

Als Startlösung diente 0,02 molare Phosphatpufferlösung pH7,2, die 1 mol NaCl/l enthielt. Zur Elimination wurde Propandiol in ansteigender Konzentration (0-100 %) angewendet. Das Interferon wurde durch 55-80 % Propandiol aus seiner Gelbindung verdrängt.

Bei der hydrophoben Chromatographie mit Phenylsepharose Cl-4B ergab sich ein ähnliches Elutionsprofil. Spezifische Aktivität (max. 1,6x10^7 IE IFN/mg Protein) und Ausbeute (30-40 %) waren jedoch wesentlich ungünstiger.

Die Verdrängung des Interferons durch 55-80 %iges Propandiol von beiden Gelen spricht für hydrophobe Bindung nicht nur an Phenylsepharose, sondern auch an Blue Sepharose.

Bei der Reinigung des Interferons waren eine Reihe technischer Probleme zu lösen: Stabilitätsprüfungen zeigen, daß Fibroblasteninterferon in 50 % Propandiollösung bei 4^{o}C 5 Tage lang keinen Aktivitätsverlust erleidet. Zusatz von Lanthanazetat zur Pufferlösung erbrachte entgegen den Angaben in der Literatur keine höhere Ausbeute, sondern verringerte diese.

Ebenso erwies sich die Silikonisierung des Säulenglases als ungünstig.

Als einzige von 7 geprüften Proteinbestimmungsmethoden war die mit Fluorescamin geeignet, in Gegenwart von 50% Propandiol Proteinkonzentrationen von minimal 500 ng/ml exakt nachzuweisen.

Literatur

1. Adams,A., Strander,H., Cantell,K. : Sensitivity of the Epstein-Barr virus transformed human lymphoid cell lines to interferon.
J.Gen.Virol.28, 207-217 (1975)

2. Anfinsen,C.B., Bose,S., Corley,L., Gurari´Rothman,D. : Partial purification of human interferon by affinity chromatography :
Proc.Natl.Acad.Sci. 71, 3139-3142 (1974)

3. Baron,S. : Mechanism of recovery from viral infection
Adv.Virus Res. 10, 39 (1963)

4. Baron,S., Buckler,C.E.: Circulating interferon in mice after intravenous injection of virus
Science 141, 1061-1063 (1963)

5. Berg,K., Heron,J., Hamilton,R.: Purification of human interferon by antibody affinity chromatography, using highly absorbed anti-interferon
Scand.J.Immunol. 8, 429-436 (1978)

6. Berthold,W., Tan,C.Tan,Y.H. : Purification and in vitro labeling of interferon from a human fibroblastoid cell line
J.Biol.Chem. 253, No.14, 5206-5213 (1978)

7. Blomgren,H., Cantell,K., Jahansson,B., Lagergren,C., Ringborg,U., Strander,H. : Interferon therapy in Hodgin ´s disease
Acta Med. Scand. 199, 527-532 (1976)

8. Böhlen,P., Stein,S., Dairman,W., Udenfriend,S., : Flourometric assay of proteins in the nanogram range
Arch.Biochem.Biophys. 155, 213-220 (1973)

9. Bollin,E.jun. Sulkowsky,E. : Metal chelate affinity chromatography of hamster interferon
Arch.Virol. 58, 149-152 (1978)

10. Brodeur,B.R., Merigan,T.C. : Mechanism of the suppressive effect of interferon on antibody synthesis in vivo
J.Immunol. 114, 1323-1328 (1975)

11. Burke,D.C.: The Status of interferon
Scientific American 236, 42-50 (1977)

12. Burke,D.C.: Biological properties of virus-induced interferon in the interferon-system:a current review to 1978
Texas Reports on Biology and Medicine, Galveston Texas, 11-16 (1978)

13. Burke,D.C.: The clinical use of human interferon: current experience and future perspectives
Behring Inst.Mitt. 63, 113-122 (1973)

14. Carter,W.A.,Horoszewicz,J.S.: Production, purification and clinical application of human fibroblast interferon
Pharmac.Ther. 8, 359-377 (1981)

15. Chada,K.C., Grob,P.M., Mikuski,A.J., Davis,L.R.jun., Sulkowski,E. : Copper chelate affinity chromatography of human fibroblast and leucocyte interferon
J.gen.Virol. 43, 701-706 (1979)

16. Crane,J.C.Jr., Glasgow,L.A., Kern,E.R., Youngner,J.S.: Inhibition of murine osteogenic sarcomas by treatment with type I or type II interferon
J.Nat.Cancer Inst. 61, 871-874 (1978)

17. Dahl,H., : Human interferon and cell growth inhibition II.Biological and physico-chemical properties of the growth inhibitory component
Acta path. microbiol.scand.Sect.B. 85, 54-60 (1977)

18. Dahl,H., Strander,H. : Human leucocyte interferon and cell growth inhibition. Quantitative differentiation following SDS-treatment
Abstract in: Symposium on Interferon and the control of cell-virus interactions,Rehovot,Israel,May 2-6 (1977)

19. Davey,M.,W., Huang,J.W., Sulkowski,E., Carter,W.:
Hydrophobic interaction of human interferon with concavalin A-agarose
J.Biol.Chem. 249, 6354-6355 (1974)

20. Davey,M.,W., Sulkowsky,E., Carter,W.A.: Binding of human fibroblast interferon to concavalin A-agarose: Involvement of carbohydrate recognition and hydrophobic interaction
Biochemistry 15, 704-713 (1976)

21. Davey,M.,W., Sulkowsky,E., Carter,W.: Hydrophobic interaction of human, mouse and rabbit interferons with immobilized hydrocarbons
J.Biol.Chem. 251, 7620-7625 (1976)

22. De Somer,P., Jonian,M., Edy,V.G., Billiau,A.: Mass production of human interferon in diploid cells
In "The production and use interferon for the treatment and prevention of human virus infection" pp 39-46. Waymouth,E.Hrsg.Rockville,Md: The Tissue Culture Association

23. Edy,V.G., Billiau,A.,Joniau,M.,De Somer,P.: Stabilization of mouse and human interferons by acid pH against inactivation due to shaking and guanidine hydrochloride
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 146, 249-253 (1974)

24. Edy,V.G., Billiau,A.,De Somer,P.:
Purification of human fibroblast interferon by zinc chelate affinity chromatography
J.Biol.Chem. 252, 5934-5935 (1977)

25. Fantes,K.:Purification and properties of human interferon
Ann.N.Y.Acad.Sci. 173, 118-121 (1970)

26. Finter,N.B.: Interferons and interferon inducers in vivo
Amsterdam:North-Holland Publ.Comp., 295-362(1973)

27. Frayssinet,C., Gresser,I., Tovey,M., Lindahl,P.:
Inhibitory effect of potent interferon preparation on the regeneration of mouse liver after partial hepatectomy-Nature, 245, 146 (1973)

28. Friesen,H.J., Stein,S., Evinger,M., Familletti,P.C., Moschera,J., Meienhofer,J., Shively,J., Pestka,S.:
Purification and molecular characterization of human fibroblast interferon
Arch.Biochem.Biophys. 206, 432-450 (1981)

29. Gisler,R.H.,Lindahl,P., Gresser,I.: Effects of interferon on antibody synthesis in vitro
J.Immunol. 113, 438-444 (1974)

30. Glasgow,L.A.: Leucocytes andinterferon in the host response to viral infections; II.Enhanced interferon response of leucocytes from immune animals
J.Bact. 91, 2185-2191 (1966)

31. Gresser,J.: Antitumor effects of interferon
Adv.Cancer Res. 16, 97-140 (1972)

32. Grossberg,S.E.: The interferon and their inducers: molecular and therapeutic considerations
N.Engl. J.Med. 287, 13-19, 79-85, 122-128 (1972)

33. Havell,E.A., Berman,B., Ogburn,C.A., Berg,K., Paucker,K., Vilcek,J. : Two antigenically distinct species of human interferon
Proc.Nat.Acad.Sci. 72, 2185-2187 (1975)

34. Heine,J.W., Mikulski,A.J., Sulkowsky,E., Carter,W.A.:
Stabilization of hu fibroblast interferon purified on concavalin A-agarose
Archives of Virology 57, 185-188 (1978)

35. Ho,M., Armstrong,J.A.: Interferon
Ann.Rev.Microbiol. 29, 131-161 (1975)

36. Horoszewicz,J.S., Leong,S.S., Ito,M., Buffet,R.T., Karakousis,C., Holyke,E., Job,L., Dolen,J.G., Carter,W.A.:
Human fibroblast interferon in human neoplasia: clinical and labaratory study
Cancer Treatment Reports 62, No.11, 1899-1906 (1978)

37. Huang,K.Y., Donahue,R.M., Gordon,F.B., Dressler,H.R.:
Enhancement of phagocytosis by interferon-containing preparations
Infection and Immunity 4, 581-588 (1971)

38. Isaacs,A., Lindenmann,J.: Virus interference I. The interferon
Proc.Royal Soc.Ser.B. 147, 258-267 (1957)

39. Isaacs,A.: Interferon
Adv.Virus Res. 10, 1 (1963)

40. Jankowsky,W.J., Davey,M.W., OMalley,J.A., Sulkowsky,E., Carter,E.A.,: Molecular structure of human fibroblast and leucocyte interferons: Probe by lectin and hydrophobic chromatography
J.Virol. 16, 1124-1130 (1975)

41. Jariwalla,R.J., Grossberg,S.E., Sedmak,J.J.: The influence of physicochemical factors on the thermal inactivation of murine interferon
Arch.Virol. 49, 261-272 (1975)

42. Jariwalla,R.J., Grossberg,S.E., Sedmak,J.J.: Effect of chaotropic salts and protein denaturants on the thermal stability of mouse fibroblast interferon
J.Gen.Virol. 35, 45-52 (1977)

43. Johnson,H.M., Smith,B.G., Baron,S.: Inhibition of the primary in vitro antibody response by interferon preparations
J.Immunol. 114, 403-409 (1975)

44. Knight,E.Jr.: Interferon: purification and initial characterization from human diploid cells
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 73, 520-523 (1976)

45. Knight,E.,: Human fibroblast interferon: amino acid analysis and amino terminal amino acid sequence
Science 207, 525-526 (1980)

46. Kuwata,T., Fuse,A., Moringaga,N.: Effect of cycloheximid and puromycin on the antiviral and anticellular activities of human interferon
J.Gen.Virol. 37, 195-198 (1977)

47. Lindahl,P. Influence of interferon on normal cell functions
Thesis:Institut de Recherches, Scientifiques
sur le Cancer, Villejuif,France, Department of
Virology, Karolinska Institut, Stockholm (1974)

48. Marshall,L.W., Pitha,P.M., Carter,W.:Inactivation of interferon:the effect of protonation
Virol. 48, 607-611 (1972)

49. Mellstedt,H., Björkholm,M., Johnsson, Ahre,A., Holm,G., Strander,H. Interferon in myelomatosis
Lancet 1, 245-247 (1979)

50. Merigan,T.C.:Interferon:Inducers and some aspects of host resistance in malignancy
Cancer chemotherapy Rep. 58, 571 (1974)

51. Merigan,T.C.:Antivirals with clinical potential
J.Infect.Dis. 133, Suppl.273 (1976)

52. Paucker,K., Dalton,B.J., Tötmä,E.T.:Similar biological properties of two major components in human leucocyte interferon
Abstract, in: Symposium on interferons and the control of cell-virus interactions, Rehovot, Israel, May 2-6, (1977)

53. Peterson,G.L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et al.which is more generally applicable
Anal.Biochem. 83, 346-356 (1977)

54. Priestman,T.J.: Interferon: an anti-cancer agent?
Cancer Treatment Reviews 6, 223-237 (1979)

55. Secher,D.S., Burke,D.C. A monoclonal antibody for large-scale purification of human leucocyte interferon
Nature 285, 446-450 (1980)

56. Sedmak,J.J., Grossberg,S.E.: A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G 250
Anal.Biochem., 79, 544-552 (1977)

57. Sedmak,J.J., Grossberg,S.E.: Interferon stabilization and enhancement by Rare Earth Salts
J.gen.Virol. 52, 195-198 (1981)

58. Sedmak,J.J. Jameson,P., Grossberg,S.E.: Thermal and vortical stability of purified human fibroblast interferon in: Human Interferon Production and Clinical Use 133-152. Edited by W.R.Stinebring and R.J. Chapple, New York:Plenum Press (1978)

59. Stewart,W.E.,De Somer,P., Edy,V.G.,Paucker,K., Berg,K., Ogburn,C.A.: Distinct molecular species of human interferons: requirements for stabilization and reactivation of leucocyte and fibroblast interferons
J.Gen.Virol. 26, 327-331 (1975)

60. Strander,H., Cantell,K.,Jakobsson,P.H., Nilsonne,U., Söderberg,G.: Exogenous interferon therapy of osteogenic sarcoma
Acta orthop.Scand., 958-967 (1974)

61. Strander,H., Einhorn,S.: Effect of human leucocyte interferon on the growth of human osteosarcoma cells in tissue culture
Int.J.Cancer, 19, 468-471 (1977)

62. Strander,H., Cantell,K., Ingimarsson,S., Jacobsson,P.A., Nilsonne,U., Söderberg,G.: Interferon treatment of osteogenic sarcoma: a clinical trial
Fogarty Intern.Center Proc.(Washington D.C.) 28, 377-380 (1977)

63. Vallbracht,A., Treuner,J., Flehmig,B., Joester,K.E., Niethammer,D.: Interferon-neutralizing antibodies in a patient treated with human fibroblast interferon
Nature 289, 496-497 (1981)

64. Vilcek,J. : Protein chemistry and molecular biology of interferon: A secular view
Abstract,in: Symposium on interferon and the control of cell-virus interactions
Rehovot, Israel, May 2-6 (1977)

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz.
Dr.E. H e i d e m a n n für die Überlassung
des Themas und für die immer freundliche Beratung und Unterstützung.
Ebenso danke ich Fräulein U. Reichmann und Herrn
Dipl.-phys. W.Michel, die mir beide eine große
Hilfe waren.

L e b e n s l a u f

Am 30.8.1958 wurde ich, Claudia Wojatschek, als Tochter des Prokuristen Harry Wojatschek und seiner Ehefrau Isolde, geborene Herold, in Stuttgart-Bad Cannstatt geboren.

Nach 4 jährigem Besuch der Grundschule in Ludwigsburg besuchte ich die hiesige Elly-Heuss-Knapp-Realschule.

Nach Abschluß der 9. Klasse wechselte ich für ein Jahr in die Förderklasse der Realschule West in Ludwigsburg über und besuchte danach die 11. Klasse des Schiller-Gymnasiums in Ludwigsburg.

Nach bestandener Reifeprüfung am 25.Mai 1977 nahm ich im Wintersemester 1977/78 das Studium der Medizin an der Universität Hohenheim auf.

Nach den ersten beiden Semestern setzte ich mein Studium an der Universität Tübingen fort. Hier legte ich am 13.September 1979 die ärztliche Vorprüfung, am 15.September 1980 den ersten und am 3.September 1982 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Das Praktische Jahr absolvierte ich am Diakonissen- und am Bürgerhospital in Stuttgart und beendete mein Studium am 17. 10. 1983 erfolgreich mit dem dritten Teil der ärztlichen Prüfung.